УДК 636.09:616.981.25:619
DOI: 10.31073/vet_biotech43-17

ШЕВЧЕНКО М.В.[1*], e-mail: makc.7991@gmail.com,
ТАРАСОВ О.А.[2], канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: ast97@ukr.net,
АНДРІЙЧУК А.В.[1], канд. вет. наук, доц., e-mail: andriichuk.av@gmail.com,
ГОНЧАРЕНКО В.П.[1], канд. вет. наук, доц., e-mail: gon4arenko2008@ukr.net,
ЦАРЕНКО Т.М.[1], канд. вет. наук, доц., e-mail: taras.m.tsarenko@gmail.com

[1]*Білоцерківський національний аграрний університет*
[2]*Інституту ветеринарної медицини НААН*

ОПТИМІЗАЦІЯ ЛАБОРАТОРНИХ ПЛР-ПРОТОКОЛІВ ДЛЯ ТОЧНОЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ *S. AUREUS* ТА *S. PSEUDINTERMEDIUS* У СОБАК

У публікації представлені результати оптимізації протоколу ПЛР для виявлення бактерій виду S. aureus та S. pseudintermedius. У результаті дослідження було визначено оптимальну температуру відпалу в межах 51–61°С (рекомендовано в оптимізованому протоколі 56°С) для обох пар праймерів. Чутливість реакції із цільовою ДНК, виділеною із бактеріальних суспензій в концентрації складала 1,5×10^5 КУО/см^3.

Отриманий у реакції ПЛР амплікон був секвенований методом Сенгера. Біоінформаційний аналіз отриманої послідовності підтвердив її гомологічність з відомим геномом S. pseudintermedius.

Отриманий позитивний контроль може бути використаний для видової ідентифікації стафілококів у тварин.

Ключові слова: *ПЛР, оптимізація протоколу, собаки, секвенування, позитивний контроль.*

Вступ. Коагулазопозитивні стафілококи (CoPS) – поширена група збудників, що викликають інфекції різних систем та органів у тварин та людей. У собак зустрічаються такі види: *S. pseudintermedius*, *S. aureus* та *S. coagulans* (раніше *S. schleiferi subsp. coagulans*). При цьому *S. pseudintermedius* найпоширеніший представник роду стафілококів, що викликає інфекції та колонізує організм собак [1, 2]. У матеріалах, відібраних від собак, *S. aureus* ідентифікують рідше, проте цей мікроорганізм видоспецифічний для людей, отже має значний зоонозний потенціал [3].

Власники собак-компаньйонів можуть за певних умов бути заражені *S. aureus*, а також можуть виступати носіями цього патогену. Частина ізолятів, отриманих в одному домогосподарстві, від собак та людей мали однакові генотипи та профілі стійкості до антибіотиків, що свідчить про їх спільне

[*] Аспірант, науковий керівник – канд. вет. наук., доц., **Т.М. Царенко**

походження [4]. Передача *S. pseudintermedius* від собаки до собаки виявляється частіше, ніж від собаки до людини. Проте певні ризики колонізації людей цим собачим патогеном все одно існують: у деяких власників виявляли штами *S. pseudintermedius,* ідентичні їхнім домашнім тваринам [5]. Досить часто *S. pseudintermedius* викликає інфекції в людей після укусів собак. Якщо в лабораторії не проводять додаткових досліджень, направлених на диференціацію *S. aureus* від інших коагулазопозитивних видів стафілококів, ізоляти *S. pseudintermedius* можуть бути помилково ідентифіковані як *S. aureus*. Шведське дослідження вказує на те, що кількість таких хибнопозитивних звітів може бути досить значною [6]. У супровідних документах важливо зазначати, коли матеріал для дослідження був відібраний з рани, причиненої укусом собаки [7].

Помилки під час ідентифікації та диференціації бактерій видів *S. pseudintermedius* та *S. aureus* призводять до значних ризиків у контексті набуття цими збудниками стійкості до метициліну [8]. Циркуляція генів стійкості до антибіотиків забезпечується мобільними генетичними елементами, тварини колонізовані стійкими до антибіотиків збудниками є джерелом таких мобільних елементів [9]. Розуміння джерела походження стійкого штаму необхідне для вироблення оптимальної системи управління ризиками. Наприклад, домашні тварини можуть сприяти повторному зараженню людей, від яких вони отримали колонізацію стійким інфекційним агентом [10]. Метицилінстійкі стафілококки – одні з найпоширеніших збудників нозокоміальних хвороб у тварин [11]. Вони можуть колонізувати не тільки внутрішньолікарняні поверхні, а й повітря, утворюючи біоаерозолі [12]. Це становить небезпеку як для тварин, що надходять до ветеринарної клініки, так і для лікарського та технічного персоналу.

Для виявлення стійкості *S. aureus* стандарт EUCAST рекомендує використовувати антибіотик цефокситин, тоді як для *S. pseudintermedius* – оксацилін. Кореляції зони затримки росту цефокситин та наявності генів *mecA* у представників таргетної групи не було виявлено [13].

Оскільки *S. aureus* та *S. pseudintermedius* мають ряд спільних фенотипових ознак їх диференціація мікробіологічними методами ускладнена. Необхідно застосовувати додаткові реакції, направлені на виявлення ферментації мальтози, стійкості до антибіотика *Polymyxin B*, продукції бета галактозидази [14, 15].

Проте використання вищезгаданих біохімічних реакцій не дає можливості диференціювати *S. pseudintermedius* від інших представників групи *S. intermedius* (SIG). Тому клінічним лабораторіям рекомендується не покладатися виключно на фенотипічні тести і розглянути можливість підтвердження за допомогою

інших методів [6]. Для розв'язання цієї задачі можна використовувати MALDI-TOF MS або молекулярно генетичні методи [7].

Sasaki et al. (2010) розробили протокол мультиплексного ПЛР для ідентифікації та диференціації збудників групи SIG. Цей метод може бути використаний для остаточної ідентифікації *S. pseudintermedius* при інфекціях собак або диференціації різних видів коагулазопозитивних стафілококів [15]. Для ефективного впровадження протоколів ПЛР у внутрішньолабораторну практику необхідна оптимізація температури відпалу для праймерів в комбінації з полімеразою, що використовується лабораторією. Також необхідне визначення концентрації ДНК, за якого чутливість і специфічність протоколу буде на високому рівні [16, 17].

Метою роботи було оптимізувати протокол ПЛР для виявлення бактерій виду *S. aureus* та *S. pseudintermedius*.

Матеріал і методи дослідження. *Музейні штами, що використані в дослідженні:* позитивний контроль *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus subsp. aureus* УКМ В-918, негативний контроль – *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Enterococcus faecalis* ATCC 194433. Музейні штами зберігались в напіврідкому середовищі за температури 4°С. Для дослідження їх пересівали з напіврідкого агару на чашку Петрі з агаровим середовищем PCA (HiMedia Laboratories, Індія) та культивували протягом доби за температури 37°С. Для виділення ДНК 4–5 типових колоній з поверхні агару бактеріологічною петлею переносили в 1 мл стерильного фізіологічного розчину та розводили за стандартом McFarland.

Бактеріальні культури, отримані від собак. Мазок відбирали за допомогою стерильного ватного аплікатора, змоченого у стерильному фізрозчині. Первинний посів проводили на поверхню маніто-сольового агару (Conda, Іспанія). Маніт-ферментуючі колонії пересівали на нову агарову пластину для отримання чистої культури. Бактеріальні клітини фарбували за Грамом та проводили дослідження на наявність ферментів коагулази, каталази та цитохромоксидази. У дослідженні використано п'ять коагулазопозитивних стафілококів, отриманих від собак.

Виявлення каталази. На предметне скло наносили краплю перекису водню (Ілан Фарм, Україна), в який вносили бактеріальну петлю чистої культури. Наявність активного піноутворення свідчило про позитивну реакцію.

Виявлення цитохромоксидази. На поверхню тест-стрічки OXItest (Erba, Чехія) наносили бактеріальну культуру та втирали її в поверхню тестової зони. Зміна кольору через 1–2 хвилини на синій колір свідчило про наявність ферменту.

Реакція коагуляції. Цитровану плазму кроля (Біолік фарм, Україна) розводили в стерильному фізіологічному розчині. У 0,5 мл розведеної плазми вносили бактеріальну петлю чистої культури стафілококів. Утворення згустку свідчило про наявність ферменту коагулази.

Виділення ДНК. ДНК з бактеріальної суспензії виділяли за допомогою набору IndiSpin Pathogen Kit (Indical, Німеччина), використовуючи стандартну інструкцію. Для виділення ДНК відбирали 200 мкл кожного розведення бактеріальної суспензії.

ПЛР дослідження. Реакцію ампліфікації проводили в реакційній суміші об'ємом 25 мкл, яка включала: 12,5 мкл готового ПЛР міксу OneTaq®2X Master Mix with Standard Buffer (New England Biolabs, США), 7,5 мкл деіонізованої води, по 1 мкл кожного з праймерів і 3 мкл ДНК. Ампліфікацію проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, США).

У дослідженні були використані праймери на виявлення *S. aureus* R 5′-TCGCTTGCTATGATTGTGG-3′ F 5′-GCCAATGTTCTACCATAGC-3′ (розмір ампліфікату 359 пн) та *S. pseudintermedius* R 5′-TRGGCAGTAGGATTCGTTAA-3′, F 5′-CTTTTGTGCTYCMTTTTGG-3′ (розмір ампліфікату 926 пн).

Температурний режим: активація полімерази – 94°C 1 хв, денатурація 94°C – 30 с, відпал – градієнт температури, елонгація 68°C – 60 с, фінальна елонгація 68°C – 5 хв. Детекція результатів реакції проходила в 1,4% агарозному гелі з додаванням 0,1% броміду етідію.

Визначення аналітичної чутливості. Бактеріальну масу вносили в 1 мл стерильного фізіологічного розчину та доводили до концентрації, що відповідає стандарту каламутності McFarland 4, 2, 1 та 0,5. Найнижчу концентрацію додатково розводили методом серійних розведень в 10, 100 та 1000 разів (до найменшої концентрації $1,5\times10^5$ КУО/см^3). Була визначена оптична щільність кожного розведення за довжини хвилі 590 нм за допомогою колориметра фотоелектричного концентраційного КФК-2МП.

Визначення оптимальної температури відпалу. Температура відпалу для кожного праймера розраховували за допомогою NEB Tm Calculator (https://tmcalculator.neb.com/#!/main). Для оптимізації температури в межах протоколу був застосований метод градієнта температур з кроком у 2°C в межах ± 5°C від теоретично розрахованої оптимальної температури (51–59°C).

Секвенування за Сенгером проводила компанія Explogen (Львів, Україна). Для секвенування використовували 50 мкл амплікону, отриманого в результаті проведення ПЛР за протоколом, зазначеним вище. Вирівнювання та отримання консенсусної послідовності проводили в програмі MEGA V.11 (https://www.megasoftware.net/). Аналіз консенсусної послідовності проводили

за допомогою програмного забезпечення BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Результати досліджень та їх обговорення. За результатами досліджень оптимальна температура відпалу для праймера націленого на ділянку гена *S. aureus* встановлена в межах 53–61°C (табл. 1). Музейні культури *S. aureus* утворювали специфічний продукт реакції розміром 359 пн за використання усіх обраних температур відпалу. За температури 51°C були присутні неспецифічні фрагменти. Інші досліджені кокові музейні культури не утворювали продуктів реакцій.

Таблиця 1

Результати оптимізації температури відпалу

Температура	Позитивний контроль	Негативний контроль	Результат оптимізації
51°C	2/2 наявні неспецифічні фрагменти	0/3 наявні неспецифічні фрагменти	Низька температура
53°C	2/2 чіткі бенди	0/3	Оптимальна температура
55°C	2/2 чіткі бенди	0/3	Оптимальна температура
57°C	2/2 чіткі бенди	0/3	Оптимальна температура
59°C	2/2 чіткі бенди	0/3	Оптимальна температура
59°C	2/2 чіткі бенди	0/3	Оптимальна температура

Продукт реакції утворився з п’ятьма розведеннями обох бактеріальних культур 4, 2, 1, 0,5 та 0,5:10 за стандартом McFarland (OD 590 0,156; 0,135; 0,067; 0,061; 0,029; 0,024; 0,019; 0,018; та 0.013; 0,011). Під час дослідження ДНК, отриманої з розведень 0,5:100 та 0,5:1000, продукт реакції не утворювався (табл. 2).

Оптимізація протоколу з використання праймера, направленого на ділянку гена *S. pseudintermedius,* ускладнена відсутністю позитивного контролю у вигляді музейного штаму. Оскільки *S. pseudintermedius* схожий за своїми культуральними властивостями до *S. aureus,* були вивчені коагулазопозитивні ізоляти, отримані від собак. Пари праймерів, відібраних з літератури, розроблялися під мультиплексну реакцію і мають схожі протоколи за умов використання однакової полімерази. Протокол родинної та видової ідентифікації був оптимізований раніше [16]. Тому комбінацією мікробіологічних та молекулярно-генетичних методів було чітко встановлено належність ізолятів до родини стафілококів. Всі маніт-ферментуючі, каталазо- та коагулазопозитивні коки утворили специфічний продукт реакції з

праймером, направленим на виявлення *Staphylococcus spp*. Одна з п'яти досліджуваних культур утворила специфічний продукт реакції з праймером для видового визначення *S. aureus*. Специфічність реакції підтверджена наявністю продукту з позитивним музейним штамом. Надалі всі коагулазопозитивні стафілококи були розділені на дві групи: золотистий стафілокок та інші стафілококи. За результатами ПЛР-дослідження, спрямованого на виявлення фрагменту гена *S. pseudintermedius*, було встановлено, що ізоляти з групи інших стафілококів, належать до цього виду. Температура відпалу для цього протоколу була обрана 56°С, концентрація бактеріальної суспензії – 4 одиниці за стандартом McFarland. Продукт реакції з музейними культурами *S. aureus, S. epidermidis, Str. pneumoniae* та *E. faecalis* не утворювався.

Таблиця 2

Аналітична чутливість протоколу в залежності від ступеня розведення бактеріальної суспензії

Розведення	Штами *S. aureus* середнє OD 590	Наявність продукту реакції	Ізоляти *S. pseudintermedius* Середнє OD 590	Наявність продукту реакції
4	0,150	Присутній	0,145	Присутній
2	0,067	Присутній	0,064	Присутній
1	0,032	Присутній	0,027	Присутній
0,5	0,023	Присутній	0,018	Присутній
0,5:10	0,016	Присутній	0,012	Присутній
0,5:100	0,007	Відсутній	0,004	Відсутній
0,5:1000	0	Відсутній	0	Відсутній

Дві чисті культури *S. pseudintermedius* були потворно використані для встановлення аналітичної чутливості протоколу. Ми отримали такий самий результат, як і для протоколу виявлення *S. aureus*. Розведення 4, 2, 1, 0,5 та 0,5:10 (OD 590 0,156; 0,135; 0,067; 0,061; 0,029; 0,024; 0,019; 0,018; та 0,013; 0,011) утворювали специфічний продукт реакції. Нижчі розведення відповідний продукт реакції не утворювали (табл. 2).

Для підтвердження отриманого ДНК як позитивного контролю було проведено секвенування методом Сенгера. Дві проби ДНК від *S. pseudintermedius,* отримані в різні часові етапи дослідження, були секвеновані з використанням обох праймерів. Послідовності отримані з форвард та реверс праймером були вирівняні, а отримана консенсусна послідовність проаналізована.

Результати вирівнювання в BLAST двох консенсусних послідовностей підтвердило їх гомологію. Обидві послідовності були порівняні з еталонним

геномом NCIB GCF_016126715.1. Перша послідовність розміром 866 пн відповідає ділянці хромосомного геному 1526300–1527164 та має ідентичність 99,31%. Друга послідовність розміром 814 пн відповідає ділянці хромосомного геному 1526351–1527163 та має ідентичність 99,26% (рис. 1).

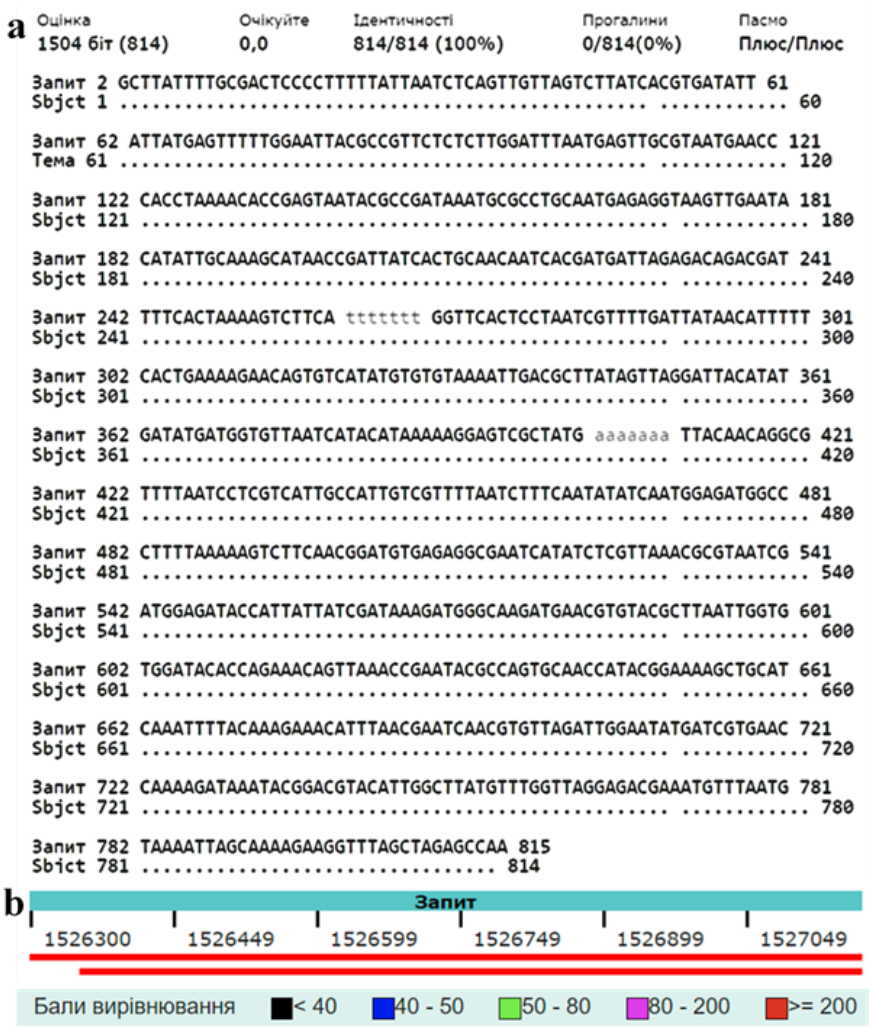

Рис. 1. Результати аналізу послідовності амплікону: a) порівняння двох послідовностей між собою; b) порівняння отриманих послідовностей з референсним геномом.

Розроблені протоколи реакції показали високу специфічність у всіх протестованих умовах. За застосування негативного контроля продукт ампліфікації не утворювався. Аналітична чутливість реакції була визначена для різних концентрацій бактеріальних суспензій, що важливо для відбору проб.

У межах наведеного дослідження вперше в Україні було секвеновано ділянку геному бактерій виду *S. pseudintermedius*. Отримане ДНК буде використане як позитивний контроль під час проведення молекулярно-генетичних методів досліджень та для остаточного підтвердження виду чистих

культур. Надалі планується визначення межі чутливості для різних концентрацій ДНК.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. В результаті проведених досліджень оптимізовано за температурою відпалу протокол видової ідентифікації бактерій *S. pseudintermedius* та *S. aureus* методом ПЛР із електрофоретичним детектуванням продуктів реакції.

2. Оптимальна температура відпалу встановлена в межах 51–61°C (рекомендовано в оптимізованому протоколі 56°C) для обох пар праймерів. Продукт реакції утворювався з ДНК виділеним із бактеріальних суспензій у концентрації до $1{,}5\times10^5$ КУО/см^3.

3. Секвенування амплікона підтвердило його приналежність до родини *S. pseudintermedius*.

Виділене ДНК буде використане у подальших дослідженнях як підтверджений позитивний контроль.

OPTIMIZATION OF LABORATORY PCR PROTOCOLS FOR THE ACCURATE IDENTIFICATION OF *S. AUREUS* AND *S. PSEUDINTERMEDIUS* IN DOGS /

Shevchenko M., Tarasov O., Andriichuk A., Honcharenko V., Tsarenko T.

Introduction. *Coagulase-positive staphylococci (CPCs) are a group of pathogenic microorganisms that can cause infections in both animals and humans. In dogs, Staphylococcus pseudintermedius is a common colonizer of healthy animals, while Staphylococcus aureus is less common in dogs. However, both of these bacteria can be zoonotic, i.e. transmitted from humans to dogs.*

Distinguishing between S. aureus and S. pseudintermedius is difficult, and traditional biochemical tests may not provide accurate results.

Misidentification is particularly dangerous in the context of antibiotic resistance as understanding the source of resistant strains is crucial for effective risk management.

The goal of the work *was to optimize the PCR protocol for the detection of S. aureus and S. pseudintermedius bacteria.*

Materials and methods. *The bacteria were obtained from two sources: museum specimens and samples collected from dogs.*

The initial steps included isolation and cultivation of the bacteria. For the museum strains, they were streaked on petri dishes with agar and grown at 37°C. For samples from dogs, swabs were taken and used for inoculation on mannitol agar, followed by subcultivation to obtain pure cultures. Gram staining and enzyme tests were then performed to identify bacterial species.

DNA was extracted with the IndiSpin Pathogen Kit using DNA obtained from different dilutions of bacterial suspensions. PCR analysis was performed to amplify specific genetic markers of S. aureus and S. pseudintermedius.

To optimize the protocol, different concentrations of bacterial mass were prepared, starting with McFarland turbidity standards of 4, 2, 1, and 0.5. The lowest concentration was further diluted by serial dilutions of 10, 100 and 1000 times. To quantify these dilutions, the optical density of each was measured at 590 nm.

To ensure the accuracy of the results, the amplicons were sequenced by Sanger, and the consensus sequences were analyzed using the BLAST program.

Results of research and discussion. *The optimal annealing temperature of the protocol using the S. aureus primer was within 53°C and 59°C. When DNA was isolated from a bacterial suspension in a dilution from 4 to 0.5:10 according to the McFarland standard, a septic reaction product was formed.*

To optimize the protocol for the detection of Staphylococcus pseudintermedius, coagulase-positive staphylococci isolated from dogs were studied. For this protocol, it was set the annealing temperature to 56°C. To confirm the accuracy of the obtained DNA samples, Sanger sequencing was performed. This sequencing approach involved analysis of consensus sequences obtained from forward and reverse primers. BLAST alignment results of these consensus sequences showed a high degree of homology, and comparison with the NCBI reference genome revealed over 99% identity.

Conclusions and prospects for further research:

1. The protocol for species identification of S. pseudintermedius and S. aureus bacteria was developed.

2. The optimal annealing temperature was within 51–61°C for both primers. The reaction product was formed from DNA isolated from bacterial suspensions in a concentration from 4 to 0.5:10 according to the McFarland standard.

3. Sequencing of the amplicon confirmed its belonging to the S. pseudintermedius family.

The isolated DNA will be used in further studies as a confirmed positive control.

Keywords: *PCR, protocol optimization, dogs, sequencing, positive control.*

REFERENCES

1. Abdullahi, I.N., Zarazaga, M., Campaña-Burguet, A., Eguizábal, P., Lozano, C., & Torres, C. (2022). Nasal Staphylococcus aureus and *S. pseudintermedius* carriage in healthy dogs and cats: A systematic review of their antibiotic resistance, virulence and genetic lineages of zoonotic relevance. *Journal of Applied Microbiology,* 133(6), 3368-3390. https://doi.org/10.1111/jam.15803.

2. Bzdil, J., Zouharova, M., Nedbalcova, K., Sladecek, V., Senk, D., & Holy, O. (2021). Oxacillin (Methicillin) Resistant Staphylococci in Domestic Animals in the Czech Republic. *Pathogens,* 10(12), 1585. https://doi.org/10.3390/pathogens10121585.

3. Sahin-Tóth, J., Kovács, E., Tóthpál, A., Juhász, J., Forró, B., Bányai, K., Havril, K., Horváth, A., Ghidán, Á., & Dobay, O. (2021). Whole genome sequencing of coagulase positive staphylococci from a dog-and-owner screening survey. *PLOS ONE,* 16(1), e0245351. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245351.

4. Cuny, C., Layer-Nicolaou, F., Weber, R., Köck, R., & Witte, W. (2022). Colonization of Dogs and Their Owners with Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintermedius in Households, Veterinary Practices, and Healthcare Facilities. *Microorganisms,* 10(4), 677. https://doi.org/10.3390/microorganisms10040677.

5. González-Martín, M., Corbera, J. A., Suárez-Bonnet, A., & Tejedor-Junco, M. T. (2020). Virulence factors in coagulase-positive staphylococci of veterinary interest other than Staphylococcus aureus. *Veterinary Quarterly,* 40(1), 118-131. https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1748253.

6. Börjesson, S., Gómez-Sanz, E., Ekström, K., Torres, C., & Grönlund, U. (2015). Staphylococcus pseudintermedius can be misdiagnosed as Staphylococcus aureus in humans with

dog bite wounds. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases,* 34(4), 839-844. https://doi.org/10.1007/s10096-014-2300-y.

7. Bibby, H. L., & Brown, K. L. (2021). Identification of Staphylococcus pseudintermedius Isolates from Wound Cultures by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Improves Accuracy of Susceptibility Reporting at an Increase in Cost. *Journal of Clinical Microbiology,* 59(11), e00973-21. https://doi.org/10.1128/JCM.00973-21.

8. Carroll, K.C., Burnham, C.-A.D., & Westblade, L.F. (2021). From canines to humans: Clinical importance of Staphylococcus pseudintermedius. *PLOS Pathogens,* 17(12), e1009961. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009961.

9. Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews,* 31(4), e00020-18. https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18.

10. Ferradas, C., Cotter, C., Shahbazian, J.H., Iverson, S.A., Baron, P., Misic, A.M., Brazil, A.M., Rankin, S.C., Nachamkin, I., Ferguson, J.M., Peng, R.D., Bilker, W.B., Lautenbach, E., Morris, D.O., Lescano, A.G., & Davis, M.F. (2022). Risk factors for antimicrobial resistance among Staphylococcus isolated from pets living with a patient diagnosed with methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. *Zoonoses and Public Health,* 69(5), 550-559. https://doi.org/10.1111/zph.12946.

11. Sebola, D.C., Oguttu, J.W., Kock, M.M., & Qekwana, D.N. (2023). Hospital-acquired and zoonotic bacteria from a veterinary hospital and their associated antimicrobial-susceptibility profiles: A systematic review. *Frontiers in Veterinary Science,* 9, 1087052. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1087052.

12. Mocherniuk, M., Kukhtyn, M., & Horiuk, Y. (2023). Chutlyvist mikrobioty bioaerozoliu ta poverkhon boksiv dlia peretrymuvannia tvaryn u veterynarnykh klinikakh do antymikrobnykh preparativ [Sensitivity of microbiota of bioaerosol and surfaces of boxes for holding animals in veterinary clinics to antimicrobial drugs]. *Naukovyi visnyk LNU veterynarnoi medytsyny ta biotekhnolohii – Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies,* 25(109), 53-58. https://doi.org/10.32718/nvlvet10909 [in Ukrainian].

13. Yarbrough, M.L., Lainhart, W., & Burnham, C.-A.D. (2018). Epidemiology, Clinical Characteristics, and Antimicrobial Susceptibility Profiles of Human Clinical Isolates of Staphylococcus intermedius Group. *Journal of Clinical Microbiology,* 56(3), e01788-17. https://doi.org/10.1128/JCM.01788-17.

14. Bhooshan, S., Negi, V., & Khatri, P.K. (2020). Staphylococcus pseudintermedius: An undocumented, emerging pathogen in humans. *GMS Hygiene and Infection Control,* 15, Doc32. https://doi.org/10.3205/DGKH000367.

15. Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtsuka, M., Hirotaki, S., Kawakami, T., Fukata, T., & Hiramatsu, K. (2010). Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology,* 48(3), 765-769. https://doi.org/10.1128/JCM.01232-09.

16. Ishchenko, V.D., Voloshchuk, N.M., Sterlikova, O.M., Humenyuk, L.V., Sklyar, V.V., Kalakaylo, L.I., Ishchenko, Y.A., & Ishchenko, L.M. (2019). Vnutrishnolaboratorna aprobatsiia praimeriv dlia molekuliarno-henetychnoi identyfikatsii hrybiv rodu Fusarium link [Interlaboratory aprobation of primers for molecular genetic identification of Fusarium link fungus]. *Naukovi dopovidi NUBIP Ukrainy – Scientific reports of NULES of Ukraine,* 6(82). https://doi.org/10.31548/dopovidi2019.06.017 [in Ukrainian].

17. Shevchenko, M., Tyshkivska, N., Andriychuk, A., Martynenko, O., & Tsarenko, T. (2022). Vnutrishnolaboratorna aprobatsiia protokolu PLR dlia molekuliarno-henetychnoi identyfikatsii bakterii rodu Staphylococcus spp. [Intralaboratory testing of the PCR protocol for molecular genetic identification of bacteria of the genus Staphylococcus spp.]. *Naukovyi visnyk veterynarnoi medytsyny – Scientific Journal of Veterinary Medicine,* 1(173), 81-91. https://doi.org/10.33245/2310-4902-2022-173-1-81-91 [in Ukrainian].